

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number:

2003-289868

(43) Date of publication of application: 14.10.2003

(51)Int.CI.

C12N 15/09 C07K 14/195 C12J 1/00 C12N 1/21

(21)Application number: 2002-098770

(71)Applicant: MITSUKAN GROUP HONSHA:KK

(22)Date of filing:

01.04.2002

(72)Inventor: NAKANO SHIGERU

(54) ACETIC ACID RESISTANCE GENE, ACETOBACTER BRED BY USING THE GENE AND METHOD FOR PRODUCING VINEGAR BY USING THE ACETOBACTER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new acetic acid resistance gene associated with the acetic acid resistance, a microorganism containing the gene, and to provide a method for producing vinegar having a high concentration of acetic acid by using the microorganism. SOLUTION: A protein having the acetic acid resistance and having a specific amino acid sequence, the DNA encoding the protein, the microorganism containing the DNA, and the method for producing the vinegar having the high concentration of acetic acid by using the microorganism are provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

29.03.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

MENU SEARCH INDEX DETAIL JAPANESE

1/1



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号 特開2003-289868 (P2003-289868A)

(43)公開日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(51) Int.Cl. ⁷		截別記号	F I 〒-マコード(参考)
C12N	15/09	ZNA	C 0 7 K 14/195 4 B 0 2 4
C07K	14/195		C 1 2 J 1/00 Z 4 B 0 2 8
C12J	1/00		C 1 2 N 1/21 4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/21		15/00 ZNAA 4H045
			審査請求 未請求 請求項の数9 OL (全 20 頁)
(21)出願番号	}	特顧2002-98770(P2002-98770)	(71)出願人 398065531 株式会社ミツカングループ本社
(22)出顧日		平成14年4月1日(2002.4.1)	愛知県半田市中村町2丁目6番地
(,,,,,,,,,,			(72)発明者 中野 繁
			愛知県知多郡阿久比町卯坂字坂部28
			(74)代理人 100091096
			弁理士 平木 祐輔 (外2名)
			Fターム(参考) 4B024 AA05 BA77 BA80 CA01 DA05
			GA11 GA19 HA20
			4B028 BC07 BC10 BL22 BP12 BX10
			4B065 AA02X AA02Y AB01 AC14
			BA02 BB06 BC15 CA10 CA42
			4H045 AA10 BA10 CA11 EA01 FA74
		,	

(54) 【発明の名称】 酢酸耐性遺伝子、鼓遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び酸酢酸菌を用いた食酢の製造方法

(57)【要約】

(修正有)

【課題】 酢酸耐性に関与する新規な酢酸耐性遺伝子を 提供すること、及び該遺伝子を含む微生物並びに該微生 物を用いて高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を 提供すること

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有する酢酸耐性を有する蛋白質、これら蛋白質をコードするDNA、これらDNAを含む微生物及びこれら微生物を用いた高酢酸濃度の食酢の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のタンパク質。

- (a)配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。
- (b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質。

- (a)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。
- (b)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項3】 以下の(a) 又は(b) のタンパク質をコード するDNA。

- (a)配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。
- (b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項4】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコード するDNA。

- (a)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。
- (b)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【請求項5】 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

- (a)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号30 1~2073からなるDNA。
- (b)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号30 1~2073からなる塩基配列からなるDNA又は該D NA配列の一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢 酸耐性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるD NA

- (a)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号33 1~2154からなるDNA。
- (b)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号33 1~2154からなる塩基配列からなるDNA又は該DNA配列の一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項7】 請求項3、4,5又は6に記載のDNA

を細胞内に含む酢酸耐性を有する微生物又は前記酢酸耐性を有しかつその耐性が増強された微生物。

【請求項8】 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする請の 求項7に記載の微生物。

【請求項9】 請求項7又は8に記載の微生物を、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

[0001]

10 【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物に由来する 酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードす る遺伝子、該遺伝子を含む微生物、特にアセトバクター 15 属 (Acetobacter) 及びグルコンアセトバクター属 (Glu conacetobacter) に属する酢酸菌、及びこれらの微生物 を用いて高濃度の酢酸を含有する食酢を効率良く製造す る方法に関する。

[0002]

20 【従来の技術】酢酸菌は食酢製造に広く利用されている 微生物であり、特にアセトバクター属及びグルコンアセ トバクター属に属する酢酸菌が工業的な酢酸発酵に利用 されている。

【0003】酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸 菌によって酸化されて酢酸に変換され、その結果、酢酸 が培地中に蓄積することになるが、酢酸は酢酸菌にとっ ても阻害的であり、酢酸の蓄積量が増大して培地中の酢 酸濃度が高くなるにつれて酢酸菌の増殖能力や発酵能力 は次第に低下する。

30 【0004】そのため、酢酸発酵においては、より高い 酢酸濃度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、す なわち酢酸耐性の強い酢酸菌を開発することが求められ ており、その一手段として、酢酸耐性に関与する酢酸耐 性遺伝子(Acetic acid resistance gene) をクローニン 35 グし、その酢酸耐性遺伝子を用いて酢酸菌を育種、改良 することが試みられている。

【0005】これまでの酢酸菌の酢酸耐性遺伝子に関する知見としては、アセトバクター属の酢酸菌の酢酸耐性を変異させて酢酸感受性にした株を元の耐性に回復させることのできる相補遺伝子として、クラスターを形成する3つの遺伝子(aarA、aarB、aarC)がクローニングされていた(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 172巻, 2096頁, 1990年)。

- 5 【0006】この内、aarA遺伝子はクエン酸合成酵素をコードする遺伝子であり、又、aarC遺伝子は酢酸の資化に関係する酵素をコードする遺伝子であると推定されたが、aarB遺伝子については機能が不明であった(ジャーナル・オブ・ファーメンテイション・アン
- 50 ド・バイオエンジニアリング (J. Ferment. Bioen

g.), 76巻, 270頁, 1993年)。

【0007】これらの3つの酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片をマルチコピープラスミドにクローニングし、アセトバクター・アセチ・サブスペシーズ・ザイリナム I FO3288(Acetobacter aceti subsp. xylinum IFO3288)株に形質転換して得られた形質転換株は、酢酸耐性の向上程度が僅かでしかなく、また実際の酢酸発酵での能力の向上の有無については不明であった(特開平3-219878分報)。

【0008】一方、酢酸菌からクローニングされた膜結合型アルデヒド脱水素酵素(ALDH)をコードする遺伝子を酢酸菌に導入することによって、酢酸発酵において最終到達酢酸濃度の向上が認められた例が特開平2~2364号公報に開示されている。しかし、ALDHはアルデヒドを酸化する機能を有する酵素であって酢酸耐性に直接関係する酵素ではないことから、ALDHをコードする遺伝子が真に酢酸耐性遺伝子であるとは断定できないものであった。

【0009】このような実情から、酢酸耐性を実用レベルで向上させうる機能を有するタンパク質をコードする新規な酢酸耐性遺伝子を取得し、また取得した酢酸耐性遺伝子を用いて、より強い酢酸耐性を有する酢酸菌を育種することが望まれていた。

[0010]

【発明が解決するための課題】本発明は、酢酸菌に属する微生物由来の酢酸耐性に関与する新規な酢酸耐性遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の酢酸耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供することを課題とするものである。

[0011]

【課題を解決するための手段】本発明者らは、酢酸存在下でも増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な酢酸耐性に関与する酢酸耐性遺伝子が存在するとの仮説を立て、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の酢酸耐性を向上させることができ、さらには高濃度の酢酸を含有する食酢の効率的な製造法を開発することが可能になると考えた。

【0012】従来の酢酸耐性遺伝子の取得方法は、酢酸菌の酢酸感受性の変異株を相補する遺伝子をクローニングする方法などが一般的であった。

【0013】しかし、このような方法では産業上有用な 酢酸耐性遺伝子を見出すことは困難であると考え、鋭意 検討した結果、本発明者らは、酢酸菌から酢酸耐性遺伝 子を見出す方法として、酢酸の存在下で特異的に発現し ているタンパク質を検索し、そのタンパク質をコードす る遺伝子を取得するといった、従来全く行われていなか った方法を開発した。

【0014】この方法によって、実際に食酢製造に用い

られているアセトバクター属とグルコンアセトバクター 属に属する酢酸菌から、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な酢酸耐性遺伝子をクローニング することに成功した。

【0015】得られた酢酸耐性遺伝子は、大腸菌などで見出されており、ATPバインディングカセット(ATP binding cassette)を有するABCトランスポーターと称される一群のタンパク質に共通する特徴的な塩基配列を有しており、酢酸菌のABCトランスポーターをコードする遺伝子(ABCトランスポーター遺伝子)であると推定された。

【0016】しかし、取得された酢酸菌の酢酸耐性遺伝子を、大腸菌などの他の微生物で見出されている既知のABCトランスポーター遺伝子と比較したところ、相同15性がきわめて低くかったことから、ATP結合部位を有する点では他のABCトランスポーター遺伝子と似ているものの該酢酸耐性遺伝子は酢酸菌に特異的な新規タンパク質をコードする新規遺伝子であるこが判った。

【0017】一方、取得された酢酸耐性遺伝子につい 20 て、食酢製造に使用されているアセトバクター属の酢酸 菌由来のものとグルコンアセトバクター属の酢酸菌由来 のもので比較したところ、両者の相同性は約70%であ り、酢酸菌間での相同性は高かった。

【0018】さらに、取得された酢酸耐性遺伝子を用い 25 た相同組換えによって該酢酸耐性遺伝子を破壊した酢酸 菌は、酢酸に対する耐性が低下するが、類縁の各種有機 酸に対する耐性はほとんど変化しなかったことから、該 酢酸耐性遺伝子は酢酸に対する耐性に特異的に関与する 遺伝子であることが明らかとなった。

30 【0019】また、該遺伝子をプラスミドベクターに連結して酢酸菌に形質転換してコピー数を増幅させた形質転換株においては、顕著に酢酸耐性が向上し、その結果、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期が短縮する上に、増殖速度が向上し、35 さらに最終到達酢酸濃度が顕著に向上し、より高酢酸濃度の食酢を効率的に製造できることなどを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下の

 $(1) \sim (9)$ からなるものである。

【0020】(1) 以下の(a)又は(b)のタンパク質。 40 (a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。

(b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【0021】(2) 以下の(a)又は(b)のタンパク質。 (a)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。

(b)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列におい 50 て、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付 加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【0022】(3) 以下の(a)又は(b)のタンパク質を コードするDNA。

- (a)配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。
- (b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【0023】(4) 以下の(a)又は(b)のタンパク質を コードするDNA。

- (a)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する タンパク質。
- (b) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質。

【0024】(5) 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

- (a)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号30 1~2073からなるDNA。
- (b)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号30 1~2073からなる塩基配列からなるDNA又は該DNA配列の一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0025】(6) 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

- (a)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号33 1~2154からなるDNA。
- (b)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号33 1~2154からなる塩基配列からなるDNA又は該DNA配列の一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0026】(7) (3)、(4), (5)又は

(6) に記載のDNAを細胞内に含む酢酸耐性を有する 微生物又は前記酢酸耐性を有しかつ酢酸耐性が増強され た微生物。

【0027】(8) 微生物がアセトバクター属、又は グルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴と する請求項(7)に記載の微生物。

【0028】(9) (7) 又は(8) に記載の微生物を、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

【0029】本発明によれば、微生物に対して、酢酸に対する耐性を付与し、増強することができる。そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌において

は、酢酸に対する耐性が顕著に向上し、培地中に高濃度 の酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができ る。

[0030]

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。(1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、ATPバインディングカセット(AT P binding cassette)を持つなど、ABCトランスポーターのモチーフを有し、且つ酢酸耐性を向上させる機能 を有する配列表配列番号2又は4に示すアミノ酸配列を

を有する配列表配列番号2又は4に示すアミノ酸配列を 有するタンパク質をコードする塩基配列を包含し、該塩 基配列の調製要素、及び該遺伝子の構造部分を含むもの である。

【0031】本発明のDNAとして、具体的には、配列 15 番号1の塩基番号301~2073又は配列表配列番号 3の331~2154からなる塩基配列を有するDNA が挙げられる。

【0032】配列番号1又は3に示す塩基配列は、DDBJ/EMBL/Genbankにおいて相同遺伝子を20検索したところ、大腸菌(Escherichia coli)のABCトランスポーター遺伝子の一つであるUUP遺伝子とアミノ酸配列レベルで38.5%、ヘモフィルス・インフルエンザエ(Haemophillus influenzae)のUUP遺伝子ともアミノ酸配列レベルで38.1%の相同性を示すことが分かったが、いずれも30%台の低い相同性であり、これらのタンパク質をコードする遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。また、上記のUUP遺伝子は機能が不明であり、当然ながら酢酸耐性と関係していることは全く知られていない。

30 【0033】本発明のDNAはその塩基配列が明らかとなったので、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマー1(配列番号5)及びプライマー2(配列番号6)として用い、酢酸菌、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株 (Acetobacte staltoacetigenes MH-24:FERM BP-491)のゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR反応)(トレンズ・オブ・ジェネテェックス(Trends Genet.)5巻,185頁,1989年)によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、前記酢酸菌のゲノムDNAイブラリーを用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。

【0034】オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々のDNA合成機を用いて定法に従って45 合成できる。また、PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems) 製のサーマルサイクラーGeneAmp2400を用い、TaqDNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を使用して、定法に従って行なうことができる。

50 【0035】本発明の酢酸耐性を増強する機能を有する

タンパク質をコードするDNAは、コードされるタンパク質の酢酸耐性又は該酢酸耐性を増強する機能が損なわれない限り、1又は複数の位置で1又は数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

【0036】このような酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換又は付加されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

【0037】また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、種間、株間、変異体、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から得ることが可能である。

【0038】具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号301~2073からなる塩基配列を有するDNAや該塩基配列の一部を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつATPバインディングカセットを有し、酢酸耐性又は該酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0039】ここでいうストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸同士、例えば70%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSCで0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

【0040】(2)本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する細菌をさし、酢酸耐性が増強されたアセトバクター属の細菌及びグルコンアセトバクター属の細菌、または酢酸耐性が低下したアセトバクター属の細菌及びグルコンアセトバクター属の細菌である。

【0041】アセトバクター属の細菌として、具体的に はアセトバクター・アセチ (Acetobacter aceti) が挙 げられ、アセトバクター・アセチNo. 1023 (Acet obacter aceti No. 1023) 株 (特許生物寄託センター にFERM BP-2287として寄託) が例示される。

(0042) また、グルコンアセトバクター属の細菌としては、グルコンアセトバクター・エンタニイ (Glucon acetobacter entanii) が挙げられ、アセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (Acetobacter altoacet igenes MH-24) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託) が例示される。

【0043】酢酸耐性の増強は、例えば酢酸耐性遺伝子 の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の 構造遺伝子を含むDNA断片をアセトバクター属の酢酸 菌の中で効率よく機能するプロモーター配列に連結して 15 得られる組換えDNAを用いて、アセトバクター属酢酸 菌を形質転換することによって増強することができる。 【0044】また、染色体DNA上の該遺伝子のプロモ ーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバク ター属の酢酸菌中で効率よく機能する他のプロモーター 20 配列、例えば大腸菌のプラスミドpBR322 (宝酒造 社製)のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミドpHSG 298 (宝酒造社製) のカナマイシン耐性遺伝子、プラ スミドpHSG396 (宝酒造社製) のクロラムフェニ コール耐性遺伝子、βーガラクトシダーゼ遺伝子などの 25 各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来 のプロモーター配列に置き換えることによっても、酢酸 耐性を増強することができる。

【0045】該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を保持するマルチコピーベクターをアセトバクター 30 属酢酸菌の細胞に導入することによって行なうことができる。すなわち、該遺伝子を保持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

35 【0046】マルチコピーベクターとしては、pMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメト・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55巻, 171頁, 1989年)やpTA5001(a)、pTA5001(b) (特開昭60-9488号公報)などが挙げられ、染色体組み込み型ベクターであるpMVL1 (アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.) 52巻, 3125頁, 1988年)も挙げられる。また、トランスポゾンとしては、MuやIS1452などが挙げられる。

45 【0047】アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌へのDNAの導入は、塩化カルシュウム法(アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.) 49巻, p.2091, 1985年)やエレクトロポレーション法(バイオサイ50 エンス・バイオテクノロジイー・アンド・バイオケミス

トリー (Biosci. Biotech. Biochem.) 、58巻、97 4頁、1994年) 等によって行うことができる。

【0048】アルコール酸化能を有するアセトバクター 属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記 のようにしてその酢酸耐性を増強すると、酢酸の生産量 や生産効率を増大させることができる。

【0049】該遺伝子を破壊して酢酸耐性を低下させた アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌 は、例えば、該遺伝子の一部を破壊して不完全な形にし た遺伝子を有するDNA断片を該微生物に導入し、該微 生物の染色体上の該遺伝子との相同組換えにより、染色 体DNAに不完全な形の遺伝子を組み込むことにより得 ることができる。

【0050】具体的には、例えば、該遺伝子内部にカナマイシン等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子を挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌を形質転換し、カナマイシン等の薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上に元々存在する該遺伝子配列との組換えを起こし、染色体上の該遺伝子が薬剤マーカー遺伝子を挿入した不完全な形の該遺伝子と入れ替わったものである。

【0051】(3)食酢製造法

上記のようにして、酢酸耐性遺伝子のコピー数が増幅されたことにより酢酸耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌であって、アルコール酸化能を有するものをアルコール含有培地で培養し、該培地中に酢酸を生産蓄積せしめることにより、食酢を効率よく製造することができる。

【0052】本発明の製造法における酢酸発酵は、従来の酢酸菌の発酵法による食酢の製造法と同様にして行なえば良い。酢酸発酵に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、エタノールを含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適当量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。

【0053】炭素源としては、グルコースやシュークロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸が挙げられる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

【0054】また、培養は、静置培養法、振盪培養法、通気攪拌培養法等の好気的条件下で行ない、培養温度は通常30℃で行なう。培地のpHは通常2.5~7の範囲であり、2.7~6.5の範囲が好ましく、各種酸、各種塩基、緩衝液等によって調製することもできる。通常1~21日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸が蓄積する。以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

[0055]

【実施例】(実施例1)アセトバクター・アセチの酢酸耐性遺伝子のクローニングと該遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列の決定

(1) 酢酸耐性遺伝子のクローニング

05 アセトバクター・アセチNo. 1023 (Acetobacter aceti No. 1023) 株 (FERM BP-2287) を1%の酢酸を含むYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン)を用いて、30℃で24時間振盪培養した。培養後、培養液を遠心分離

(7,500×g、10分)して菌体を得た。また、酢酸を含まないYPG培地でも、同様にして培養して、菌体を得た。

【0056】得られたこれらの菌体を、それぞれソニケーションにより破砕し、その菌体破砕液を遠心分離(1 2,000×g、10分間)して得られた上澄液を、さらに超遠心分離(400,000×g、1時間)を行なうことによって沈殿物(不溶性蛋白質)を得た。その後、この沈殿物を50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に懸濁した。

 20 【0057】この懸濁した沈殿物を2×SDS-PAG E泳動緩衝液 (0.125MTris-HCl (pH 6.8)、10%2-Mercaptoethano l、4%SDS、10%Sucrose、0.004% Bromophenolblue)に1:1の比率で懸 獨し、沸騰水浴中で3分間加熱処理した。このサンプル をSDS-PAGE電気泳動した後、CBB染色し、1 %の酢酸を含むYPG培地で生育したものと、酢酸を含まないYPG培地で生育したものとを比較しところ、分子量約70kDaのバンドが1%酢酸を含む培地で生育 したもので発現が増幅しているのが確認された。

【0058】このように発現が増幅していたバンドをP VDF膜に転写し、アミノ末端のアミノ酸配列をプロテ インシークエンサーにて決定した。決定したアミノ酸配 列はMet-Ala-His-Pro-Pro-Leu 35 -Leu-His-Leuであった。

【0059】上記のアミノ酸配列を基にしてオリゴヌクレオチドを合成し、これをアセトバクター・アセチNo. 1023株から定法により染色体DNAを抽出し制限酵素 PstIで完全分解したものに対して、サザンハ40 イブリダイゼーションを行なった。

【0060】その結果、約2.5kbpの位置にポジティブなバンドを確認した。このバンドをアガロースゲルより抽出し、大腸菌ベクターpUC19の制限酵素Pst J切断部位にライゲーションし、大腸菌JM109株45に形質転換し、100µg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地で選択した。出現したコロニーをサザンハイブリダイゼーションで用いたと同じオリゴヌクレオチドをプローブとし、コロニーハイブリダイゼーションを行ない、ポジティブな形質転換体を単離した。

50 【0061】その後、プラスミドDNAをポジティブな

形質転換体より分離し、挿入断片の構造を制限酵素マッピングにより解析し、その結果、図1に示した約2.5kbpのPst I 断片を確認した。

【0062】(2)クローン化された遺伝子断片の塩基配列の決定

上記挿入断片の大部分について、塩基配列をサンガーの ダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって 決定した。塩基配列の決定は、両方のDNA鎖の全領域 について行ない、切断点は全てオーバーラップする様に して行なった。その結果、配列番号1に記載した塩基配 列が決定された。

【0063】配列番号1記載の塩基配列中には、塩基番号301から塩基番号2073にかけて、配列番号2に記載したような591個のアミノ酸をコードするオープンリーディング・フレームの存在が確認された。配列番号2に記載のタンパク質のN末端側のアミノ酸配列はMet-Ala-His-Pro-Pro-Leu-Leu-His-Leu-であり、先に決定した該タンパク質のN末端側のアミノ酸配列と完全に一致することが確認された。

【0064】また、配列番号2に記載のアミノ酸配列のタンパク質には、ATPバインディングカッセットをアミノ酸番号39~46と314~321の2個所に持つなど、ABCトランスポーターのモチーフを有していることが確認された。

【0065】(実施例2)グルコンアセトバクター・エンタニイからの酢酸耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

(1) 染色体DNAライブラリーの作製

グルコンアセトバクター・エンタニイ(Gluconacetobac ter entanii)の1 菌株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24(Acetobacter altoacetigenes MH-24)株(FERM BP-491)を6%酢酸、4%エタノールを添加したYPG培地(3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン)で30℃にて振盪培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離(7,500×g、10分)し、菌体を得た。得られた菌体より、特開昭60-9489号公報に開示された方法により、染色体DNAを調製した。

【0066】上記のようにして得られた染色体DNA及び酢酸一大腸菌シャトルベクターpMV24(アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー(Appl. Environ. Microbiol.)55巻、171頁、1989年)を、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)で切断した。これらのDNAを適量ずつ混合し、ライゲーションキット(TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2、宝酒造社製)を用いて連結してグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを構築した。

【0067】(2)酢酸耐性遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを、通常は酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法(バイ05 オサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Biosci. Biotech. Biochem.),58巻、974頁、1994年)で形質転換し、2%酢酸、100μg/mlのアンピシリンを含むYPG寒天培地にて、30℃で4日間培養した。

10 【0068】生じたコロニーを100μg/mlのアンピシリン含むΥPG培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、約3.5kbpのEcoRI断片がクローン化されており、該断片の構造を制限酵素マッピングにより解析し、その結果を図2に示した。また、クローン化されたDNA断片のうち、アセトバクター・アセチNo.1023株を2%酢酸を含むΥPG培地で生育可能にする断片は、SphlーEcoRI断片であった。

【0069】このようにして通常は酢酸濃度1%程度ま でしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 10 23株を2%酢酸含有培地でも増殖可能にする上記Sp h1-EcoRI断片からなる酢酸耐性遺伝子断片を取 得1.た

【0070】(3) クローン化されたDNA断片の塩基 25 配列の決定

実施例1と同様に、酢酸耐性遺伝子を含有する断片の塩 基配列をサンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネ ーション法によって決定した。その結果、配列番号3に 記載した塩基配列が決定された。アセトバクター・アセ 30 チNo.1023株の場合と同様に、配列決定は両方の DNA鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバ ーラップする様にして行なった。

【0071】配列番号3記載の塩基配列中には、塩基番号331から塩基番号2154にかけて、配列番号4に記載したような608個のアミノ酸をコードするオープンリーディング・フレームの存在が確認された。配列番号4に記載のアミノ酸配列のタンパク質には、ATPバインディングカセットのモチーフをアミノ酸番号41~48と319~326の2個所に有していた。

【0072】(実施例3)相同組換で酢酸耐性遺伝子を 破壊させた遺伝子破壊株の造成と該遺伝子破壊株の酢酸 耐性の特異的な低下

(1) 相同組換えによる遺伝子破壊株の造成

アセトバクター・アセチNo. 1023株の酢酸耐性を 45 増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子の 破壊を目的として、図1に示すPstI断片をベクター pUC18のPstI切断部位へ組み込んだ組換えプラ スミドpUCM181を構築した後、このpUCM18 1の酢酸耐性遺伝子(Acetic acid resistance gene)

50 の中に存在するEcoRV切断部位に、プラスミドpH

SD298 (ジーン (Gene), 61巻, 63頁, 1987年) のカナマイシン耐性遺伝子を含むEcoRV断片を組み込んだ組換えプラスミドpUCMK181を構築した。

【0073】このようにして構築した p U C M K 181を、アセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法(バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Biosci. Biotech. Biochem.),58巻、974頁、1994年)で形質転換し、形質転換株をカナマイシン50μg/mlを含むYPG寒天培地(グルコース3%、酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.2%、寒天2%、p H 6.5)で選択した。

【0074】選択培地で増殖したカナマイシン耐性株から定法に従って染色体DNAを抽出し、制限酵素PstIで切断した後、酢酸耐性遺伝子を含むPstI断片とカナマイシン耐性遺伝子を含むEcoRV断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、カナマイシン耐性株の酢酸耐性遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子断片(1.67kbp)が挿入され、酢酸耐性遺伝子が破壊された酢酸耐性遺伝子破壊株が確認された。

【0075】(2)酢酸耐性遺伝子破壊株の有機酸耐性上記で得られたカナマイシン耐性株、すなわち酢酸耐性遺伝子破壊株について、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、酪酸の有機酸に対する感受性を調べた。酢酸耐性遺伝子破壊株を50μg/mlのカナマイシンを添加したYPG培地で、またその元株であるアセトバクター・アセチNο.1023株はカナマイシン無添加のYPG培地で、30℃で24時間培養して得た培養液を、1.5%の酢酸、0.02%のギ酸、0.1%のプロピオン酸、または0.1%の酪酸を添加した各YPG培地にそれぞれ1%ずつ植菌し、また有機酸無添加のYPG培地にもそれぞれ1%ずつ植菌した後、30℃にて振盪培養して増殖状況を比較した。増殖は660nmにおける吸光度で測定した。

【0076】結果を図3に示したが、酢酸以外の有機酸では、該遺伝子破壊株は元株アセトバクター・アセチNo.1023株とほぼ同等の増殖を示したが、酢酸を添加した時のみ、該遺伝子破壊株において増殖誘導期の遅延や増殖の低下が認められ、該遺伝子は酢酸に特異的な耐性に関与することが確認できた。

【0077】(実施例4)アセトバクター・アセチ由来 の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐 性の増強

(1) アセトバクター・アセチへの形質転換 アセトバクター・アセチNo. 1023株由来の酢酸耐 性遺伝子を酢酸菌—大腸菌シャトルベクターpMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー(Appl. Environ. Microbiol.)55巻,171頁,1989年)の制限酵素PstI切断部位に挿入したプラスミドpABC1を作製した。

05 【0078】このpABC1をアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法(バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Biosci. Biotech. Biochem.),58巻、974頁、1994年)によって形質転換した。形質転換株10 は100μg/mlのアンピシリン及び2%の酢酸を添加したYPG寒天培地で選択した。

【0079】選択培地上で生育したアンピシリン耐性の 形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析 し、酢酸耐性遺伝子を保有するプラスミドを保持してい 15 ることを確認した。

【0080】(2) 形質転換株の酢酸耐性 上記のようにして得られたプラスミドpABC1を有す るアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加 したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV2 20 4のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo.1 023株と比較した。

【0081】具体的には、酢酸3%、エタノール3%、アンピシリン100μg/mlを含む100mlのYP G培地にて、30℃で振盪培養(150rpm)を行な 25 い、形質転換株と元株の酢酸添加培地での増殖を660 nmにおける吸光度を測定することで比較した。

【0082】その結果、図4に示すように、形質転換株では3%酢酸と3%エタノールを添加した培地でも比較的短い誘導期の後に旺盛な増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株では誘導期が非常に長く、また増殖も比較的弱いことが確認でき、酢酸耐性遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

【0083】(実施例5)アセトバクター・アセチ由来 35 の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株の酢酸発酵 試験

実施例4で得られたプラスミドpABC1を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクターpMV24のみを有する元株アセトバクター・アセチNo.1023株と酢酸醗酵能を比較した。

【0084】具体的には、5Lのミニジャー(エイブル 社製;BMS-05) を用いて、酢酸4%、エタノー ル3%、アンピシリン100μg/mlを含む2LのY PG培地にて、30℃、300rpm、0.15vvm の通気攪拌培養を行ない、形質転換株と元株の酢酸発酵 能を比較した。その結果を表1にまとめた。

[0085]

【表1】

	最終到達酢酸	比增殖速度	生産速度	增殖誘導期
	濃度 (%)	(OD660/hr)	(%/hr)	(h r)
元株	8. 4	0.0057	0.014	190
形質転換株	10.6	0.0097	0.026	160

【0086】表1の結果から、形質転換株の方が、最終 到達酢酸濃度、比増殖速度、生酸速度、増殖誘導期の何 れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

【0087】(実施例6)グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

(1) セトバクター・アセチへの形質転換

グルコンアセトバクター・エンタニイの1菌株であるアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株由来の酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片をPCR法により増幅し、その結果得られた増幅断片をBamHI、EcoRIで切断し、この断片を酢酸菌―大腸菌シャトルベクターpMV24(アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー(Appl. Environ. Microbiol.)55巻,171頁,1989年)の制限酵素BamHI-EcoRI切断部位に挿入したプラスミドpABC11を作製した。

【0088】PCR法は具体的には次のようにして実施した。すなわち、鋳型としてアセトバクター・アセチゲネスMH-24株のゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1(配列番号5)及びプライマー2(配列番号6)を用いて、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を使用し、下記するPCR条件にてPCRを実施した。(PCR条件) 94 \mathbb{C} 15秒、60 \mathbb{C} 30秒、68 \mathbb{C} 2分を1サイクルとして、30サイクル実施した。

【0089】このpABC11をアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法(バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Biosci. Biotech. Biochem.),58巻,974 頁,1994年)によって形質転換した。形質転換株は100 μ g/mlのアンピシリン及び2%の酢酸

を添加したYPG寒天培地で選択した。

【0090】選択培地上で生育したアンピシリン耐性の 形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析 10 し、酢酸耐性遺伝子を保有するプラスミドを保持してい ることを確認した。

【0091】(2) 形質転換株の酢酸耐性

上記のようにして得られたプラスミドpABC11を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

【0092】具体的には、酢酸3%、エタノール3%、アンピシリン100μg/mlを含む100mlのYP 20 G培地にて、30℃で振盪培養(150rpm)を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での生育を660nmにおける吸光度を測定することで比較した。

【0093】その結果、図5に示すように、形質転換株では3%酢酸と3%エタノールを添加した培地でも比較的短い誘導期の後に旺盛な増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株では誘導期が非常に長く、また増殖も比較的弱いことが確認でき、酢酸耐性遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

30 [0094]

【発明の効果】本発明により、酢酸耐性に関与する新規な遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、該育種株を用いたより高酢酸濃度の食酢を高35 効率で製造する方法が提供できた。

【0095】 【配列表】

SEQUENCE LISTING .

- <110> Mitsukan Group Corporation
- <120> Acetic acid resistance gene, acetic acid bacteria transformed with said gene, and the method for producing vineger using said acetic acid bacteria

<130> P02-0012

<140>

141>

160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2414

<212> DNA

876

<220> <221> CDS 05 <222> (301)..(2073) <400> 1 gctcgcgtac ccgggcgwtc ctctagagtc atcaaccttg gcccaggtgg ggatggcata 60 caggeggtgg eggaaattac etcatettte agtgtgeegg ttatataegt aaeggegtat 120 ccagaacgtt tgctaactgg ggaaaccatg gagcccagtt ttgttattac caagccgttt 180 gaccccctta cccttgctgt tgcaacgtat caggcagtaa gcagcgcacg cacacaggcc 240 gtataagcaa aaaagcggcc tccatttcca gttctacaaa acggattatt tttttccagc 300 atg gcg cat cct ccc ctt ctt cat ctt cag gac att act ctt tca tta Met Ala His Pro Pro Leu Leu His Leu Gln Asp Ile Thr Leu Ser Leu gga ggg aac ccg ctg ctg gat ggc gcc ggt ttt gcc gtt ggg cgt ggt Gly Gly Asn Pro Leu Leu Asp Gly Ala Gly Phe Ala Val Gly Arg Gly 20 25 gag cgc ctc tgc ctt gtg ggg cga aac ggt tcg gga aag tcc acc ctg Glu Arg Leu Cys Leu Val Gly Arg Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu 40 35 ctc aaa att gct gcg ggt gtt att cag cca gat tcg ggg tct gtg ttt Leu Lys Ile Ala Ala Gly Val Ile Gln Pro Asp Ser Gly Ser Val Phe 50 gtc cag ccc ggt gct tcc ctg cgc tat ctg ccg cag gag ccg gat tta Val Gln Pro Gly Ala Ser Leu Arg Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu 75 65 70 age get tat gee aca acg geg gat tac gtt gtg gge cag att gga gae Ser Ala Tyr Ala Thr Thr Ala Asp Tyr Val Val Gly Gln Ile Gly Asp 85 ccg gat atg gca tgg cgc gcc acg cca ttg ctg gat gct ctg ggc ctg 636 Pro Asp Met Ala Trp Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Ala Leu Gly Leu 100 105 684 aca ggt agg gaa agc acg caa aat ctt tca ggc ggt gaa ggt cgg cgt Thr Gly Arg Glu Ser Thr Gln Asn Leu Ser Gly Gly Glu Gly Arg Arg 125 115 tgt gct att gct ggt gta ttg gcg gcg gcc ccc gat gtg ctg ctg ctg 732 Cys Ala Ile Ala Gly Val Leu Ala Ala Ala Pro Asp Val Leu Leu Leu 130 135 gat gag ccc acc aac cat ctg gat atg cct acc att gaa tgg ttg gag 780 Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu 145 150 828 cgt gaa ctg ctg agc ctt ggc gcc atg gta att atc agc cat gat agg Arg Glu Leu Leu Ser Leu Gly Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg 165 170

<213> Acetobacter aceti

cgg ctg ctt tcc acc ctt tca cgt tct gtt gtg tgg ctg gat cgg ggt

	Leu			Thr	Leu	Ser			Val	Val	Trp	Leu		Arg	Gly	
			180					185					190			004
					gat											924
Val	Thr		Arg	Leu	Asp	GIU		Pne	GIÀ	Arg	rne		АТА	11p	Arg	
		195					200					205	-+-	~~~		972
					cag											312
Glu		vaı	Leu	GIU	Gln	_	GIU	Arg	ASP	Ala	220	Lys	Leu	vzh	VI B	
	210					215	+	n+ ~	o art	+0+		σtο	200	aca	cac	1020
					gaa											1020
	11e	Ala	Arg	GIU	Glu	ASP	пр	Met	VI B	235	dly	١٩١	1111	VIG	240	
225			00+	at a	230 cgc	ogt	at a	caa	тээ		σca	oat	ttσ	CGC		1068
					Arg											1000
AIg	Lys	vi g	usn	245	ΜĞ	VI R	vaı	Mβ	250	Lou	1114	пор	Dou	255		_
acc	cat	220	σ α σ		att	caa	gca	ccc		acc	ctt	acc	ttg		acg	1116
					Ile											
VIT	VI R	Lys	260	па	116	ив	MIL	265	J1,	1111	Dou	****	270			
can	cta	caa		cat	cgc	аад	ctø		got	gt.g	gcc	gaa		att	agt	1164
					Arg											
0111	Leu	275	110	1113	,111 6	<i>D</i> , 5	280				•••	285				
220	aca		σσt.	gaa	aag	cag		gtt	cgc	cat	ttg	_	ctg	cgc	att	1212
					Lys											
Lys	MIG	11 P	u,	UIU	2,0	J	,									
	290					295					300					
t.t.a																
	cgt	gga	gac	cgg	ctt	ggt	att	gtg	ggg	gcc	aat	ggt	gca	ggc	aaa	1260
															aaa Lys	1260
Leu	Arg				ctt Leu 310											1260
Leu 305	Arg	Gly	Asp	Arg	Leu 310	Gly	Ile	Val	Gly	Ala 315	Asn	Gly	Ala	Gly	Lys 320	1260 1308
Leu 305 acc	Arg	Gly	Asp	Arg	Leu 310 atg	Gly	Ile	Val ggg	Gly	Ala 315 gac	Asn	Gly	Ala	Gly agt	Lys 320 ggc	
Leu 305 acc	Arg	Gly	Asp	Arg	Leu 310 atg Met	Gly	Ile	Val ggg	Gly	Ala 315 gac	Asn	Gly	Ala	Gly agt	Lys 320 ggc Gly	
Leu 305 acc Thr	aca Thr	Gly ttg Leu	Asp ttg Leu	Arg cgg Arg 325	Leu 310 atg Met	Gly cta Leu	Ile aca Thr	Val ggg Gly	Gly ctg Leu 330	Ala 315 gac Asp	Asn caa Gln	Gly ccc Pro	Ala gat Asp	Gly agt Ser 335	Lys 320 ggc Gly	
Leu 305 acc Thr	aca Thr	Gly ttg Leu tca	Asp ttg Leu	Arg cgg Arg 325 ggt	Leu 310 atg Met	Gly cta Leu tcc	Ile aca Thr	Val ggg Gly aat	ctg Leu 330	Ala 315 gac Asp	Asn caa Gln acg	ccc Pro	Ala gat Asp	agt Ser 335	Lys 320 ggc Gly	1308
Leu 305 acc Thr	aca Thr	Gly ttg Leu tca	Asp ttg Leu	cgg Arg 325 ggt Gly	Leu 310 atg Met	Gly cta Leu tcc	Ile aca Thr	Val ggg Gly aat	ctg Leu 330	Ala 315 gac Asp	Asn caa Gln acg	ccc Pro	Ala gat Asp	agt Ser 335 cag	Lys 320 ggc Gly	1308
Leu 305 acc Thr aca	aca Thr	ttg Leu tca Ser	ttg Leu ctt Leu 340	cgg Arg 325 ggt Gly	Leu 310 atg Met cct Pro	cta Leu tcc Ser	Ile aca Thr ctt Leu	ggg Gly aat Asn 345	ctg Leu 330 atg Met	Ala 315 gac Asp gtc Val	Asn caa Gln acg Thr	Gly ccc Pro	gat Asp gat Asp 350	agt Ser 335 cag Glr	Lys 320 ggc Gly g cag	1308
Leu 305 acc Thr aca Thr	aca Thr atc	ttg Leu tca Ser	ttg Leu ctt Leu 340 ctg	cgg Arg 325 ggt Gly	Leu 310 atg Met cct Pro	cta Leu tcc Ser	Ile aca Thr ctt Leu	ggg Gly aat Asn 345	ctg Leu 330 atg Met	Ala 315 gac Asp gtc Val	Asn caa Gln acg Thr	Gly ccc Pro ctg	gat Asr gat Asr 350	agt Ser 335 cag Glr	Lys 320 ggc Gly g cag Gln	1308
Leu 305 acc Thr aca Thr	aca Thr atc	ttg Leu tca Ser	ttg Leu ctt Leu 340 ctg	cgg Arg 325 ggt Gly	Leu 310 atg Met cct Pro	cta Leu tcc Ser	Ile aca Thr ctt Leu	ggg Gly aat Asn 345 aca	ctg Leu 330 atg Met	Ala 315 gac Asp gtc Val	Asn caa Gln acg Thr	Gly ccc Pro	gat Asp gat Asp 350 ttg	agt Ser 335 cag Glr	Lys 320 ggc Gly g cag	1308
Leu 305 acc Thr aca Thr Arg	aca Thr atc Ile	ttg Leu tca Ser acc Thr 355	ttg Leu ctt Leu 340 ctg	cgg Arg 325 ggt Gly aac	Leu 310 atg Met cct Pro	Cly cta Leu tcc Ser gaa Glu	Ile aca Thr ctt Leu cgc	ggg Gly aat Asn 345 aca	ctg Leu 330 atg Met	Ala 315 gac Asp gtc Val	Asn caa Gln acg Thr gat	Gly ccc Pro ctg	gat Asr gat Asr 350 ttg	Gly agt Ser 335 cag Glr gaca	Lys 320 ggc Gly g cag a Gln a gaa	1308
Leu 305 acc Thr aca Thr cga Arg	aca aca Thr atc	ttg Leu tca Ser acc Thr 355	ttg Leu ctt Leu 340 ctg Leu	Arg cgg Arg 325 ggt Gly aac	Leu 310 atg Met cct Pro ccg Pro	cta Leu tcc Ser gaa Glu	Ile aca Thr ctt Leu cgc Arg 360	ggg Gly aat Asn 345 aca Thr	ctg Leu 330 atg Met cta Leu	Alaa 315 gac Asp gtc Val gcc Alaa gaa	caaa Glm acg Thr gat Asp	Gly ccc Pro ctg ctg Leu acco Thr 365	gat gat Asp gat Asp 350 ttg Let	agt agt Ser 335 cag Glr agt Thu	Lys 320 ggc Gly g cag Gln a gaa Glu t gtg	1308 1356 1404
Leu 305 acc Thr aca Thr cga Arg	aca aca Thr atc	ttg Leu tca Ser acc Thr 355	ttg Leu ctt Leu 340 ctg Leu	Arg cgg Arg 325 ggt Gly aac	Leu 310 atg Met cct Pro ccg Pro	cta Leu tcc Ser gaa Glu	aca Thr ctt Leu cgc Arg 360 g gtt	ggg Gly aat Asn 345 aca Thr	ctg Leu 330 atg Met cta Leu	Alaa 315 gac Asp gtc Val gcc Alaa gaa	caaa Glm acg Thr gat Asp	ccc Process ctg	gat gat Asp gat Asp 350 ttg Let	agt agt Ser 335 cag Glr agt Thu	Lys 320 ggc Gly g cag a Gln a gaa	1308 1356 1404
Leu 305 acc Thr aca Thr cga Ara	aca aca aca atc Thr atc Ile	ttg Leu tca Ser acc Thr 355	ttg Leu ctt Leu 340 ctg Leu gat Asp	cgg Arg 325 ggt Gly aac	Leu 310 atg Met cct Pro	cta Leu tcc Ser gaa Glu	aca Thr ctt Leu cgc Arg 360 g gtt	ggg Gly aat Asn 345 aca Thr	ctg Leu 330 atg Met cta Leu acg	Ala 315 gac Asp gtc Val gcc Ala Glu	caa Glm acg Thr acg at Asp aag Lys 380	ccc Pro ctg ctg acco Thr 365	gat Asp Satistic A	agt agt acag gt value	Lys 320 ggc Gly g cag Gln a gaa Glu t gtg l Val	1308 1356 1404
Leu 305 acc Thr aca Thr cga Arg	aca aca Thr atc Ile atc acg Arg Arg Arg 370	ttg Leu tca Ser acces Thr 355 agge Gly	ttg Leu ctt Leu 340 ctg Leu gat Asp	Arg cgg Arg 325 ggt Gly aac Asn atg	Leu 310 atg Met cct Pro ccg Pro gtg Yal	cta Leu tcc Ser gaa Glu 375	aca Thr ctt Leu cgc Arg 360 g gtt Val	ggg Gly aat Asn 345 aca Thr	ctg Leu 330 atg Met cta Leu acg Thr	Ala 315 gac Asp gtc Val gcc Ala Glu gaz	caa Gln acg Thr Asp aag 1 Lys 380	ccc Pro ctg Leu acc Thr 365 cgc Arg	gat Asp 350 ttp Let Care His	agt agt acag acag acag acag acag acag ac	Lys 320 ggc Gly g cag Gln a gaa Glu t gtg Val	1308 1356 1404 1452
Leu 305 acc Thr aca Thr cga Arg	aca acat Thr atc Ile acgt Arg Arg Arg Arg Square Sq	ttg Leu tca Ser acces Thr 355 agge Gly	ttg Leu ctt Leu 340 ctg Leu gat Asp	Arg cgg Arg 325 ggt Gly aac Asn atg	Leu 310 atg Met cct Pro ccg Pro gtg Yal	cta Leu tcc Ser gaa Glu 375	aca Thr ctt Leu cgc Arg 360 g gtt Val	ggg Gly aat Asn 345 aca Thr	ctg Leu 330 atg Met cta Leu acg Thr	Ala 315 gac Asp gtc Val gcc Ala Glu gaz	caa Glm acg Thr acg gat Asp aag 380 a cag	ccc Pro ctg Leu acc Thr 365 cgc Arg	gat Asp 350 ttp Let Care His	agt agt acag acag acag acag acag acag ac	Lys 320 ggc Gly g cag Gln a gaa Glu t gtg l Val	1308 1356 1404 1452
Leu 305 acc Thr aca Thr cga Ara gga Gl; 383	aca acat Thr atc Ile acgt Arg Arg Arg Arg Arg Ty Ty Ty Ty Ty	ttg Leu tca Ser acc Thr 355 agge Gly tatg	ttg Leu ctt Leu 340 ctg Leu gat Asp	Arg cgg Arg 325 ggt Gly aacc Asn atg	Leu 310 atg Met cct Pro ccg Pro gtg Pro tttt	cta Leu tcc Ser gaa Glu cag Glr 375	aca Thr ctt Leu cgc Arg 360 gtt Val	ggg Gly aat Asn 345 aca Thr ggc Gly	ctg Leu 330 atg Met cta Leu acg Thr	Ala 315 gac Asp gtc Val gcc Ala Glu gaa Glu 395	Asn caa Gln acg Thr gat Asp aag 1 Lys 380 a cag a cag	Gly ccc Pro ctg Leu accc Thr 365 cgc Arg gcg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ar	gating Asp 350 care the care care care and a care and a care a ca	agtines agging acade aca	Lys 320 ggc Gly g cag Gln a gaa Glu t gtg Val a ccc r Pro 400	1308 1356 1404 1452
Leu 305 acc Thr aca Thr cga Arg Gly gga Gly 38: gt:	aca aca Thr atc Ile acg Arg Arg 370 370 4 1 1 5 5 5 a ag aca aca aca aca aca aca aca aca ac	ttgg Leu tca Ser Thr 355 agge Gly Cly Character The tree of the tr	ttg Leu ctt Leu 340 ctg Leu gat Asp Leu Leu ctg Leu ctg	Arg cgg Arg 325 ggt Gly aac Asn atg Met	Leu 310 atg Met cct Pro ccg response val	cta Leu tcc Ser gaa Glu 375 ctg	aca Thr ctt Leu cgc Arg 360 g gtt Val	ggg Gly aat Asn 345 aca Thr ggc Gly	ctg Leu 330 atg Met cta Leu acg Thr	Ala 315 gac Asp gtc Val gcc Ala Glu 395 g cgg g	caaa Glm acg Thr acg at Asp 380 acg	ccc Pro ctg Leu ctg Thr 365 cg cgc Arg	gati Asp 350 Leu cac cac cac cac cac cac cac cac cac ca	agt Ser 335 cag Glr Thi cgt Va.	Lys 320 ggc Gly g cag Gln a gaa Glu t gtg Val a ccc	1308 1356 1404 1452 1500

```
Ala Leu Ala Lys Pro Ser Asn Leu Leu Val Leu Asp Glu Pro Thr Asn
                                425
gat ctg gat ctg gaa aca ctg gat att ttg caa gac atg ctc gcc agt
Asp Leu Asp Leu Glu Thr Leu Asp Ile Leu Gln Asp Met Leu Ala Ser
                            440
                                                                   1692
tgt gaa ggc aca gtg ctg ctt gta agc cat gat cgt gat ttt ctg gat
Cys Glu Gly Thr Val Leu Leu Val Ser His Asp Arg Asp Phe Leu Asp
                        455
    450
                                                                   1740
cgg gtt gca aca tcc gtc ttg gcg aca gag gga gat ggc aac tgg ata
Arg Val Ala Thr Ser Val Leu Ala Thr Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ile
                                         475
465
                    470
gaa tat get gge gga tac agt gac atg etg get cag egg cac cag aaa
                                                                   1788
Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg His Gln Lys
                                     490
                 485
ccg ttg aca acg gcc tct gtg gtg gaa aac gaa ccc aca aaa ccc aaa
                                                                    1836
Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val Val Glu Asn Glu Pro Thr Lys Pro Lys
                                 505
             500
 gag aca act gct gcg cgt ggc ccg acc aaa aag ctg agt tat aag gac
                                                                    1884
 Glu Thr Thr Ala Ala Arg Gly Pro Thr Lys Lys Leu Ser Tyr Lys Asp
                                                 525
                             520
         515
 cag ttt gcg ctg gat aat ctg ccc aag gaa atg gaa aag ctg gaa gca
                                                                    1932
 Gln Phe Ala Leu Asp Asn Leu Pro Lys Glu Met Glu Lys Leu Glu Ala
                         535
 cag gct gcc aac tgc gtg aaa aac tgg cag atc cag att tat atg gaa
                                                                    1980
 Gln Ala Ala Asn Cys Val Lys Asn Trp Gln Ile Gln Ile Tyr Met Glu
                     550
 aaa acc ccg cgc agt ttg aga aac ttt cgg ctg att tac aga agc tcg
                                                                    2028
 Lys Thr Pro Arg Ser Leu Arg Asn Phe Arg Leu Ile Tyr Arg Ser Ser
                                      570
                                                                    2073
 aaa caa agc tgg cag aat ctg aag aac gct ggc tgg aac tgg aaa
 Lys Gln Ser Trp Gln Asn Leu Lys Asn Ala Gly Trp Asn Trp Lys
                                  585
 tgaagcgaga agccctacag gccaactaag gcaacgctat ttttcggtga accgcactct 2133
 tgcaggcggg tgggtgcaat gcctatgttt tggcatgctc tgttttactg gttctcttta 2193
  taagegeace etteetgetg geagtetgge attgettgee tttetgageg tggcacacat 2253
  tgcattcgcg caggatadac ccgccgctgc agtctcccta tagtgagtcg tattacgcgt 2313
  tctaacgaat ccatatgact wtgtagaccc tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt 2373
                                                                     2414
  yccctatagt gagtcgtatt agagcttggc gtaatgcatg a
  <210> 2
```

	00	25		30
	20 Lou Vol C		Gly Ser Gly Ly	
Glu Arg Leu C	ys Leu vai u	40	4	_ •
	la Ala Glv V		Pro Asp Ser Gl	
50		55	60	,
			Leu Pro Gln Gl	u Pro Asp Leu
65	70		75	80
		la Asp Tyr V	Val Val Gly Gl	n Ile Gly Asp
oci ma iji i	85		90	95
Pro Asp Met A		la Thr Pro I	Leu Leu Asp Al	a Leu Gly Leu
	100	105		110
Thr Gly Arg (Glu Ser Thr (31n Asn Leu	Ser Gly Gly Gl	u Gly Arg Arg
115		120	12	_
		15		
Cys Ala Ile				al Leu Leu Leu
130		135	140	L. Tarr Lau Clu
		Leu Asp Met		lu Trp Leu Glu 160
145	150	01 A1. W-A	155	
Arg Glu Leu		GIY AIA MEL	170	er His Asp Arg 175
1 1 1	165	Sor Ara Sor		eu Asp Arg Gly
		185	vai vai lip b	190
	180 Arg Leu Asn		Gly Arg Phe G	lu Ala Trp Arg
195	WIR Fed Wah	200		05
	Leu Glu Gln			ys Leu Asp Arg
210	Dog old oll	215	220	
	Arg Glu Glu	Asp Trp Met	Arg Tyr Gly V	al Thr Ala Arg
225	230		235	240
Arg Lys Arg	Asn Val Arg	Arg Val Arg	Glu Leu Ala A	sp Leu Arg Thr
-	245		250	255
Ala Arg Lys	Glu Ala Ile	Arg Ala Pro	Gly Thr Leu T	hr Leu Asn Thr
	260	265		270
Gln Leu Arg	Pro His Arg	Lys Leu Val	Ala Val Ala (Glu Asp Ile Ser
275		280		285
Lys Ala Trp	Gly Glu Lys	Gln Val Val	Arg His Leu	Asp Leu Arg Ile
290		295	300	
Leu Arg Gly	Asp Arg Leu	Gly Ile Val		Gly Ala Gly Lys
305	310		315	320
Thr Thr Leu		Leu Thr Gly		Pro Asp Ser Gly
	325		330	335
Thr Ile Ser				Leu Asp Gln Gln
	340	345		350
			r Leu Ala Asp	Thr Leu Thr Glu
355		360	The Cl. 1	365
Gly Gly Gly	7 Asp Met Val	Gin Val Gly	y inr diu Lys	Arg His Val Val

375

370

380

395 390 Val Ser Ala Leu Ser Gly Gly Glu Arg Gly Arg Leu Met Leu Ala Cys 410 405 Ala Leu Ala Lys Pro Ser Asn Leu Leu Val Leu Asp Glu Pro Thr Asn 430 425 420 Asp Leu Asp Leu Glu Thr Leu Asp Ile Leu Gln Asp Met Leu Ala Ser 440 Cys Glu Gly Thr Val Leu Leu Val Ser His Asp Arg Asp Phe Leu Asp 460 455 Arg Val Ala Thr Ser Val Leu Ala Thr Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ile 475 470 465 Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg His Gln Lys 490 Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val Val Glu Asn Glu Pro Thr Lys Pro Lys 505 Glu Thr Thr Ala Ala Arg Gly Pro Thr Lys Lys Leu Ser Tyr Lys Asp 520 Gln Phe Ala Leu Asp Asn Leu Pro Lys Glu Met Glu Lys Leu Glu Ala 535 Gln Ala Ala Asn Cys Val Lys Asn Trp Gln Ile Gln Ile Tyr Met Glu 550 Lys Thr Pro Arg Ser Leu Arg Asn Phe Arg Leu Ile Tyr Arg Ser Ser 570 565 Lys Gln Ser Trp Gln Asn Leu Lys Asn Ala Gly Trp Asn Trp Lys 590 585 580 30 <210> 3 <211> 2160 <212> DNA <213> Gluconacetobacter entanii <220> <221> CDS <222> (331)..(2154) <400> 3 atettgtgge caaggaatte ategeageee aggateetga aaateeegge gtgetgatee 60 tetecegeet tgeeggggeg geaaageage ttgaggeege cetgetggte aaceegetgg 120 atcatgacgg catggccgat gcgctggaac gcgcgctggc catgtcgccc gaggaacggc 180 gcgaacgctg gcaggcatgc tggaacagca ttgccaaccg tacggccctt ggctgggggc 240 tgtcgttcct gaacatcctt gaaaacgcga agcggcgtta agccccacac cagccttgcg 300 cacggggtgg ttgagaatac ataagtgggc atg gcc tca cct ccc ctt ctt ctc 354 Met Ala Ser Pro Pro Leu Leu Leu ctt cag gat atc acc ctg acc ctt ggc ggc gcg ccg ctg ctc aat ggc 402 Leu Gln Asp Ile Thr Leu Thr Leu Gly Gly Ala Pro Leu Leu Asn Gly 15 10

Gly Tyr Met Lys Asp Phe Leu Phe Arg Pro Glu Gln Ala Arg Thr Pro

geg ggc ttc ggc gtt ggc cct ggc ggc gcc gtc tgc ctt gtc ggg cgc Ala Gly Phe Gly Val Gly Pro Gly Glu Arg Val Cys Leu Val Gly Arg 25 30 35 40 aat ggc tgt ggc aag tcc acc ctg ctg cgc atc ggg ggg ggt gga at AAsn Gly Cys Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg 11e Ala Ala Gly Glu I1e 45 50 55 cag gcc gat gac ggc acc gtt ttt gtc cag ccc ggc acc acc gtg cgc Gln Ala Asp Asp Gly Thr Val Phe Val Gln Pro Gly Thr Thr Val Arg 60 65 70 tac ctg ccg cag gac acc gtt ctg ggg ggt gg gac acc gtt gac ctg ctg cgc gac acc gtg ggc gac ctg ggc ggc gac cag ga acc cag ctg ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc gg				
25	gcg g	ggc gag cgc gtc tgc ctt g	c ggg cgc 450)
aat ggc tgt ggc aag tcc acc ctg ctg cgc atc gcg ggg ggt gag ata Asn Gly Cys Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg Ile Ala Ala Gly Glu Ile 45 50 55 cag gcc gat gac ggc acc gtt ttt gtc cag ccc ggc acc acc ggc Gln Ala Asp Asp Gly Thr Val Phe Val Gln Pro Gly Thr Thr Val Arg 60 65 70 tac ctg ccg cag gac acc gac ctg tcg ggc ttt gac acc acc gct gat Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp 75 80 85 tac gtc ctg ctg acc ggc ggc atg ggc ctg gcc ggc gac ccg gac acc ggc ggc gac acc ggc gg	Ala G	Gly Glu Arg Val Cys Leu	l Gly Arg	
As a Gly Cys Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg Ile Ala Ala Gly Glu Ile 45				
Second S				3
cag gec gat gac gac gac acc gtt ttt gtc cag ccc ggc acc acc gtg cgc acc gtg gac acc gac	Asn C			
GIN Ala Asp Asp Gly Thr Val Phe Val Gln Pro Gly Thr Thr Val Arg 60 60 65 70 70 tac ctg cog cag gaa ccc gac ctg tcg ggc ttt gac acc acg ctg gat Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp 80 85 tac gtc cgc gcg ggc atg ggg ccg ggc gac ccg gaa tac cgc gcc gaa Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu 90 95 100 ctg ctg ctg acc gac ctg ggg ctg acc ggc acc gaa gac ccc gc acc Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gly Leu Asn Gly Thr Glu Asp Pro Ala Thr 105 110 115 120 ctg tcg ggc ggg gaa gcg cgg cgc gcg ctg gcc ctg gcc acc Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala 125 130 135 ccc gaa ccc gac ctg ctt ttg ctg gac gac ccc acc acc cac ctt gcg Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala 125 130 135 ccc gaa ccc gac ctg ctt ttg ctg gac gac ccc acc acc acc cac ctg gac Ala Cec acc acc acc acc acc acc acc acc acc a			•	a
tac ctg ccg cag gaa ccc gac ctg ttg ggc ttt gac acc acg ctg gat Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp 75 80 85 tac gtc cgc gcg ggc atg ggg ccg gac ccg gaa tac cgc gaa Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu 90 95 100 ctg ctg ctg ctg acc gaa ctg ggg ctg aac ggc gac gac gag gac acc Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gly Leu Asn Glu 105 110 115 120 ctg tcg ggc ggg gaa ggc cgc cgc tgc gcg cgc cgc cgc cct ggg ggc gac ggc gac ggc ccc Leu Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala 125 130 135 ccc gaa ccc gac ctg ctt ttg ctg gac gac ccc acc acc acc acc ctg ggc Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp 140 145 150 atg ccc acc att gaa tgg ctg gaa cgt gaa cgt gac ctg tcg ctg tcg ccg ctg tcg cacc Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Leu Glu Arg Glu Leu Glu Thr Leu Ser Ifo 155 160 165 gcc atg gtc atc ata agc cat gac cgg ggt gtc acc cgc agg ctg ctg tcg Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg Gly Val Thr Arg Arg Leu Asp Glu 185 190 195 195 ggc ttc gcc ggt tcg gac acc acc acc acc acc acc acc acc a	-			U
tac ctg ccg cag gaa ccc gac ctg ttg ggc ttt gac acc acg ctg gat Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp 75 80 85 tac gtc cgc gcg ggc atg ggg ccg ggc gac ccg gac ccc gaa tac cgc gcc gaa Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu 90 95 100 ctg ctg ctg acc gaa ctg ggg ctg aac ggc acg gaa gac ccg gcc acc Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gly Leu Asn Gly Thr Glu Asp Pro Ala Thr 105 110 115 120 ctg ttg ggc ggg gaa gcg cgc cgc tgc gcg ctg gcc cgc gcc ctt gcg Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala 125 130 135 ccc gaa ccc gac ctg ctt ttg ctg gac gac ccc acc acc acc ctg gac Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp 140 145 150 atg ccc acc att gaa tgg ctg gaa cgt gaa cgt gct gct gct gct gct gct gct gct gct	Gln A			
Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp 75 80 85 85 85 85 86 86 87 86 86 85 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86	4			4
tac gtc cgc gcg ggc atg ggc atg ggg ccg ggc ggc atg ggc ccg ggc ggc atg ggg ccg ggc ggc atg ggg ccg ggc gac ccg gaa tac cgc gaa tac cgc gaa Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu 90 95 100				•
tac gtc cgc gcg ggc atg ggg ccg ggc gac ccg gac ccg gaa tac cgc gac gac gac cgg gaa tac cgc gac gac gac gac gac gac gac gac g	1) 1: 1	a='	a bodp	
Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu 90 95 ctg ctg ctg ctg acc gaa ctg ggg ctg aac ggc acg gaa gac ccg gcc acc Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gly Leu Asn Gly Thr Glu Asp Pro Ala Thr 105 110 110 115 120 ctg tcg ggc ggg gaa gcg cgg cgc tgc gcg ctg gcc cgc gcc ctt gcc Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala 125 130 135 ccc gaa ccc gac ctg ctt ttg ctg gac gaa ccc acc acc ctg gac Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp 140 145 150 atg ccc acc att gaa tgg ctg gaa gcg gaa ctg ctg tcg ctg tca tcg Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Leu Ser Leu Ser Ser 155 gcc atg gtc atc ata agc cat gac cgc agg ctg gaa ctg ctg gaa acg ctg tcg Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg Arg Glu Leu Leu Glu Trp Leu Ser 170 175 180 cgt tcg gtc gtg tgg tgg gac cgg cgg gg gac gg gaa gag gg ctg ga cag gac Gly Phe Ala Arg Phe Glu Thr Trp Arg Glu Glu Val Leu Glu Gln Glu 205 205 210 225 226 tgg atg cgt tac ggc gg ga acc gg cgc cgc aat gtc cgc cac 170 Arg Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Asp 220 tgg atg cgt tac ggc gg gac acc gg cgc aat gtc cgc aat gtc cgc cgc 170 Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg 240 180 180 180 180 180 180 180 1	tac (ge gee gaa 64	2
90 95 100 ctg ctg ctg acc gaa cg gaa cg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg cac gag gaa gac ccg gac acc ccg ctg ctg acc gac acc ccg ctg ctg ctg ctg ctg ccg acc ccg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg				
ctg ctg ctg ctg acc gaa ctg ggg ctg ggc acc gaa gga acc gca gca gca cta flr flr Glu Ala Arg Arg cta gca cta gca gca cta cta gca cta dca dca cta cta cta gca cta dca cta cta dca cta cta cta cta gca cta cta cta cta cta cta cta cta dca cta cta cta dca cta dca cta cta dca cta cta cta gca cta cta cta dca cca cac cac cta cta cta cta cta cta cta cta	• , •			
Leu Leu Leu Leu Hr Glu Leu Gly Leu Asn Gly Thr Glu Asp Pro Ala Thr 110 115 120 ctg tcg ggc ggg gaa gcg cgg cgg cgg cgg cgg c	ctg	ctg aac ggc acg gaa gac	eg gec acc 69	0
110				
Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Iso 135 ccc gaa ccc gac cac cac acc cac cat gac gac cac acc acc cat das gac gac cac acc acc cat gac gac gac cac acc acc cat gac gac cgt gac ctg gac ctg gac ctg gac ctg gac ctg ctg gac ctg gac ctg gac ctg gac ctg gac ctg gac g				
Ccc gaa ccc gac ctg ctt ttg ctg gac gaa ccc acc acc ctg gac ctg ctg fas fas	ctg	cgc tgc gcg ctg gcc cgc	c ctt gcg 73	8
ccc gaa ccc gac ctf ttg ctg gac gaa ccc acc acc cac ctg gac Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Ash His Leu Asp His Leu Asp Glu Pro Thr Ash His Leu Asp Glu Pro Thr Asp His Leu Leu Leu Ser Leu	Leu	Arg Cys Ala Leu Ala Arg	la Leu Ala	
Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp atg ccc acc act gaa tgg ctg gaa cgt gaa ctg ctg tcg tcg tcg ctg tcg tcg ctg ctg ctg tcg ctg		130	135	
Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp atg ccc acc act gaa tgg ctg gaa cgt gaa ctg ctg tcg tcg tcg ctg tcg tcg ctg ctg ctg tcg ctg				
Pro Glu Pro Asp Leu Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp atg ccc acc act gaa tgg ctg gaa cgt gaa ctg ctg tcg tcg tcg ctg tcg tcg ctg ctg ctg tcg ctg				_
atg ccc acc att gaa tgg ctg gaa cgt gaa ctg ctg tcg ctg tcg ctg tca tcg Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Leu Cu 155 160 160 165<				36
atg ccc acc att gaa tgg ctg gaa cgt gaa ctg ctg tcg ctg tca tcg Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Leu Ser Leu Ser Ser 155	Pro			
Met Pro Thr Ile Glu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Leu Ser Leu Ser Ser Jen Ser Jen Jen <td></td> <td></td> <td></td> <td>Ŝ.4</td>				Ŝ.4
gcc atg gtc atc atc atc atc atc atc atc atc atc a				34
gcc atg gtc atc ata agc cat gac cgc agg ctg ctg gaa acg ctg tcg Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg Arg Leu Leu Glu Thr Leu Ser 170 175 180 cgt tcg gtc gtg tgg ctg gac cgg ggt gtc acc cgc agg ctg gat cag Arg Ser Val Val Trp Leu Asp Arg Gly Val Thr Arg Arg Leu Asp Gln 185 190 195 200 ggc ttc gcc cgg ttc gag aca tgg cgc gag gaa gtg ctg gag cag gag Gly Phe Ala Arg Phe Glu Thr Trp Arg Glu Glu Val Leu Glu Gln Glu 205 210 215 gag cgc gac agc cac aag ctg gac cgc cag atc gcg cgt gag gaa gac Glu Arg Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Glu Asp 220 225 230 tgg atg cgt tac ggc gtg acc gcg cgc cag cgc aat gtc cgc cgc Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg 240 240 245	Met	105	eu Ser Ser	
Ala Met Val Ile Ile Ser His Asp Arg Leu Leu Glu Thr Leu Ser cgt tcg gtc gtg gtg gtg ggg ggg ggg ggg ggg ggg ggg			og otg tog 89	82
170 175 180 cgt tcg gtc gtc gtg tgg ctg gac cgg ggt ggt gtc acc cgc agg ctg gac caggar 220 225 225 225 225 245 <td></td> <td></td> <td>-836</td> <td>J<u>u</u></td>			-836	J <u>u</u>
cgt tcg gtc gtg tgg ctg gac cgg ggt gtc acc cgc agg ctg gat cag Arg Ser Val Val Trp Leu Asp Arg Gly Val Thr Arg Arg Leu Asp Gln 185	Ala		In Dea Ger	
Arg Ser Val Trp Leu Asp Arg Gly Val Thr Arg Leu Asp Gly Val Thr Arg Arg Leu Asp Gln Arg Arg <td></td> <td>-</td> <td>tg gat cag 9</td> <td>30</td>		-	tg gat cag 9	30
185 190 195 200 ggc ttc gcc cgg ttc gag aca tgg cgc gag gaa gtg ctg gag cag gag 200 200 200 200 200 210 210 215 225 225 225 230 225 230 225 230 225 230 225 230 225 230 225 230 225 230 245 <t< td=""><td></td><td></td><td></td><td></td></t<>				
ggc ttc gcc cgg ttc gag aca tgg cgc gag gaa gtg ctg gag cag gag gag gag gag gag gag gag ga			200	
Gly Phe Ala Arg Phe Glu Thr Trp Arg Glu Glu Val Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gl			ag cag gaa 9	78
gag cgc gac agc agc cac agg cac aag ctg gac cgc cgc cag atc gcg cgt gag gaa gac ggc Glu Arg Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Asp 225 230 230 tgg atg cgt tac ggc gtg acc gcg cgg cgg cgg cgg atg gcg cgg cgc cgg cgg cgg cgg cgg aat gtc cgg cgg Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg Arg 235 240				
gag cgc gac agc cac aag ctg gac cgc cag atc gcg cgt gag gaa gac Glu Arg Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Asp 220 225 230 230 230 250 250 250 250 250 250 250 250 250 25	01,			
Glu Arg Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Asp 220 225 230 tgg atg cgt tac ggc gtg acc gcg cgc cgc aag cgc aat gtc cgc cgc Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg 235 240 245	gag	g gac cgc cag atc gcg cgt	gag gaa gac 1	026
tgg atg cgt tac ggc gtg acc gcg cgg cgc aag cgc aat gtc cgc cgg Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg 235 225 225 225 225 226 227 228 230 240 245				
tgg atg cgt tac ggc gtg acc gcg cgc cgc aag cgc aat gtc cgc cgc Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg 235 240 245	- * *			
Trp Met Arg Tyr Gly Val Thr Ala Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg 235 240 245	tgg	c gcg cgg cgc aag cgc aat	gte ege ege 1	074
235 240 245				
gtg gct gaa ctg gcc gaa ctg cgc aat acc cgt cgc acc gcc ata ag	-			
8-0 0-1 0-1 0-1 0-1 0-1 0-1 0-1 0-1 0-1 0	gtg	g cgc aat acc cgt cgc acc	gcc ata agg l	122

Val	Ala 250	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu 255	Arg	Asn	Thr	Arg	Arg 260	Thr	Ala	Ile	Arg	
cag	ccc	ggc	ggc	ctg	aag	atg	gaa	gcc	cgc	gaa	agc	gac	ctg	tcg	ggc	1170
Gln	Pro	Gly	Gly	Leu	Lys	Met	Glu	Ala	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Ser	Gly	
265					270					275					280	
aag	ctg	gtt	gcg	gtg	gca	gaa	gat	atg	tca	cgc	gcc	tat	gaç	cct	gcc	1218
Lys	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Glu	Asp	Met	Ser	Arg	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ala	
•				285					290					295		
cac	ccg	gtg	gtc	agc	cat.	ctg	gac	ctg	cgt	gtc	ctg	cgc	ggg	gac	cgg	1266
His	Pro	Val	Val	Ser	His	Leu	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Asp	Arg	
			300					305					310			
ctg	ggg	atc	gtg	ggg	gcc	aat	ggc	gcg	ggc	aag	agc	acc	ctg	ctg	cgc	1314
Leu	Gly	He	Val	Gly	Ala	Asn	Gly	Ala	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu	Leu	Arg	
		315					320					325				
ctg	ctg	acg	gga	ctg	gac	agg	ccg	gat	tcc	ggc	acc	atc	aat	atc	ggc	1362
Leu		Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	Pro	Asp	Ser	Gly	Thr	Ile	Asn	Ile	Gly	
	330					335					340					
agc	gcg	ctc	aat	gtc	gtc	aca	ctg	gac	cag	cag	cgc	cgc	tcg	ctt	gat	1410
Ser	Ala	Leu	Asn	Val	Val	Thr	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Arg	Ser	Leu	Asp	
345					350					355					360	
ccc	gac	acc	acg	ctg	gcg	gat	acg	ctg	acg	ggc	ggc	ggc	ggg	gac	atg	1458
Pro	Asp	Thr	Thr	Leu	Ala	Asp	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	
				365					370					375		1500
				aat				cat	gtc					aag		1506
			Gly	aat				His	gtc				Met	aag		1506
Val	Gln	Val	Gly 380	aat Asn	Glu	Lys	Arg	His 385	gtc Val	Ile	Gly	Tyr	Met 390	aag Lys	Asp	
Val ttc	Gln ctg	Val ttc	Gly 380 cgc	aat Asn ccc	Glu gaa	Lys cag	Arg gcg	His 385 cgt	gtc Val acc	Ile	Gly gtg	Tyr ggc	Met 390 gtg	aag Lys ctg	Asp	1506 1554
Val ttc	Gln ctg	Val ttc Phe	Gly 380 cgc	aat Asn ccc	Glu gaa	Lys cag	Arg gcg Ala	His 385	gtc Val acc	Ile	Gly gtg	Tyr ggc Gly	Met 390 gtg	aag Lys ctg	Asp	
Val ttc Phe	Gln ctg Leu	Val ttc Phe 395	Gly 380 cgc Arg	aat Asn ccc Pro	Glu gaa Glu	Lys cag Gln	Arg gcg Ala 400	His 385 cgt Arg	gtc Val acc Thr	Ile ccg Pro	Gly gtg Val	Tyr ggc Gly 405	Met 390 gtg Val	aag Lys ctg Leu	Asp tcg Ser	1554
Val ttc Phe	Gln ctg Leu ggg	Val ttc Phe 395 gag	Gly 380 cgc Arg	aat Asn ccc Pro	Glu gaa Glu cgg	Lys cag Gln ctc	gcg Ala 400	His 385 cgt Arg	gtc Val acc Thr	Ile ccg Pro	Gly gtg Val	ggc Gly 405 ctg	Met 390 gtg Val	aag Lys ctg Leu	Asp tcg Ser	
Val ttc Phe	Gln ctg Leu ggg Gly	Val ttc Phe 395 gag	Gly 380 cgc Arg	aat Asn ccc Pro	Glu gaa Glu cgg	Lys cag Gln ctc Leu	gcg Ala 400	His 385 cgt Arg	gtc Val acc Thr	Ile ccg Pro	Gly gtg Val gcg Ala	ggc Gly 405 ctg	Met 390 gtg Val	aag Lys ctg Leu	Asp tcg Ser	1554
Val ttc Phe ggg Gly	Gln ctg Leu ggg Gly 410	Val ttc Phe 395 gag Glu	Gly 380 cgc Arg cgc	aat Asn ccc Pro tgg Trp	Glu gaa Glu cgg Arg	cag Gln ctc Leu 415	Arg gcg Ala 400 atg Met	His 385 cgt Arg ctg Leu	gtc Val acc Thr gcc Ala	Cys	Gly gtg Val gcg Ala 420	ggc Gly 405 ctg Leu	Met 390 gtg Val gcg Ala	aag Lys ctg Leu cgg Arg	tcg Ser ccg Pro	1554 1602
Val ttc Phe ggg Gly	Gln ctg Leu ggg Gly 410 aac	Val ttc Phe 395 gag Glu	Gly 380 cgc Arg cgc Arg	aat Asn ccc Pro tgg Trp	Glu gaa Glu cgg Arg	cag Gln ctc Leu 415 gac	gcg Ala 400 atg Met	His 385 cgt Arg ctg Leu	gtc Val acc Thr gcc Ala	Cys	gtg Val gcg Ala 420 gac	ggc Gly 405 ctg Leu	Met 390 gtg Val gcg Ala	aag Lys ctg Leu cgg Arg	tcg Ser ccg Pro	1554
ttc Phe ggg Gly tcc Ser	Gln ctg Leu ggg Gly 410 aac	Val ttc Phe 395 gag Glu	Gly 380 cgc Arg cgc Arg	aat Asn ccc Pro tgg Trp	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu	cag Gln ctc Leu 415 gac	gcg Ala 400 atg Met	His 385 cgt Arg ctg Leu	gtc Val acc Thr gcc Ala	ccg Pro tgc Cys aac Asn	gtg Val gcg Ala 420 gac	ggc Gly 405 ctg Leu	Met 390 gtg Val gcg Ala	aag Lys ctg Leu cgg Arg	tcg Ser ccg Pro	1554 1602
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425	Gln ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu	Gly 380 cgc Arg cgc Arg ctg Leu	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp	gcg Ala 400 atg Met gag Glu	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro	gtc Val acc Thr gcc Ala acc	Ccg Pro tgc Cys aac Asn 435	Gly gtg Val gcg Ala 420 gac Asp	ggc Gly 405 ctg Leu ctt	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440	1554 1602 1650
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg	Ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac	Gly 380 cgc Arg cgc Arg Leu ctg	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp	Arg gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr	Cys aac Asn 435	Gly gtg Val gcg Ala 420 gac Asp	Tyr ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg	1554 1602
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg	Ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac	Gly 380 cgc Arg cgc Arg Leu ctg	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val ctg Leu	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp	Arg gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr	Cys aac Asn 435	Gly gtg Val gcg Ala 420 gac Asp	Tyr ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu acg Thr	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg	1554 1602 1650
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg Thr	Gln ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn ctc Leu	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac Asp	Gly 380 cgc Arg cgc Arg ctg Leu ctg Leu	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val ctg Leu 445	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430 cag Gln	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp	gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg Met	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr gcc Ala 450	Cys aac Asn 435 agc Ser	Gly gtg Val gcg Ala 420 gac Asp tat Tyr	Tyr ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu tcc Ser	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu acg Thr 455	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg Val	1554 1602 1650 1698
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg Thr	ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn ctc Leu	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac Asp	Gly 380 cgc Arg cgc Arg ctg Leu ctg Leu agc	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val ctg Leu 445 cat	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430 cag Gln	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp gac Asp	Arg gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg Met	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro ctg Leu	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr gcc Ala 450 ctc	ccg Pro tgc Cys aac Asn 435 agc Ser	Gly gtg Val gcg Ala 420 gac Asp tat Tyr	Tyr ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu tcc Ser	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp ggc Gly	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu acg Thr 455 tcc	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg Val	1554 1602 1650
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg Thr	ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn ctc Leu	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac Asp	Gly 380 cgc Arg cgc Arg ctg Leu ctg Leu agc Ser	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val ctg Leu 445 cat	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430 cag Gln	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp gac Asp	Arg gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg Met	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro ctg Leu ttc	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr gcc Ala 450 ctc	ccg Pro tgc Cys aac Asn 435 agc Ser	Gly gtg Val gcg Ala 420 gac Asp tat Tyr	Tyr ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu tcc Ser	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp ggc Gly	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu acg Thr 455 tcc	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg Val	1554 1602 1650 1698
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg Thr ctg Leu	ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn ctc Leu	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac Asp gtc Val	Gly 380 cgc Arg cgc Arg ctg Leu ctg Leu agc Ser 460	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val ctg Leu 445 cat His	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430 cag Gln gac Asp	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp gac Asp	Arg gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg Met gac Asp	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro ctg Leu ttc	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr gcc Ala 450 ctc Leu	ccg Pro tgc Cys aac Asn 435 agc Ser gac Asp	Gly gtg Val gcg Ala 420 gac Asp tat Tyr cgg Arg	Tyr ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu tcc Ser gtc Val	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp ggc Gly gcc Ala 470	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu acg Thr 455 tcc Ser	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg Val tcc	1554 1602 1650 1698
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg Thr ctg Leu	ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn ctc Leu ctg Leu	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac Asp gtc Val	Gly 380 cgc Arg cgc Arg ctg Leu ctg Leu agc Ser 460 gcg	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val ctg Leu 445 cat His	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430 cag Gln gac Asp	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp gac Asp cgt Arg	gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg Met gac Asp	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro ctg Leu ttc Phe 465 aag	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr gcc Ala 450 ctc Leu	ccg Pro tgc Cys aac Asn 435 agc Ser gac Asp	gtg Val gcg Ala 420 gac Asp tat Tyr cgg Arg	ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu tcc Ser gtc Val	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp ggc Gly gcc Ala 470 gcc	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu acg Thr 455 tcc Ser	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg Val tcc Ser	1554 1602 1650 1698
ttc Phe ggg Gly tcc Ser 425 acg Thr ctg Leu	ctg Leu ggg Gly 410 aac Asn ctc Leu ctg Leu	Val ttc Phe 395 gag Glu ctg Leu gac Asp gtc Val	Gly 380 cgc Arg cgc Arg ctg Leu ctg Leu agc Ser 460 gcg	aat Asn ccc Pro tgg Trp gtg Val ctg Leu 445 cat His	Glu gaa Glu cgg Arg ctg Leu 430 cag Gln gac Asp	cag Gln ctc Leu 415 gac Asp gac Asp cgt Arg	gcg Ala 400 atg Met gag Glu atg Met gac Asp	His 385 cgt Arg ctg Leu ccg Pro ctg Leu ttc	gtc Val acc Thr gcc Ala acc Thr gcc Ala 450 ctc Leu	ccg Pro tgc Cys aac Asn 435 agc Ser gac Asp	gtg Val gcg Ala 420 gac Asp tat Tyr cgg Arg	ggc Gly 405 ctg Leu ctt Leu tcc Ser gtc Val	Met 390 gtg Val gcg Ala gac Asp ggc Gly gcc Ala 470 gcc	aag Lys ctg Leu cgg Arg ctt Leu acg Thr 455 tcc Ser	tcg Ser ccg Pro gaa Glu 440 gtg Val tcc Ser	1554 1602 1650 1698

```
Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg Gln Asp Ala Thr Leu Ala Ala Arg
                        495
ccc cgg cag gac cgc gcg gaa acc aca ccg gcc aga acc gat gtg acc
Pro Arg Gln Asp Arg Ala Glu Thr Thr Pro Ala Arg Thr Asp Val Thr
505
                    510
                                        515
ecg tee tee tee eec egg cag eec geg ege aag atg teg tac aag gac
                                                                   1938
Pro Ser Ser Ser Pro Arg Gln Pro Ala Arg Lys Met Ser Tyr Lys Asp
                                    530
                525
aag cac gcg ctg gaa cag cta ccc aag cag atg gcg gcg ctg gag acg
                                                                   1986
Lys His Ala Leu Glu Gln Leu Pro Lys Gln Met Ala Ala Leu Glu Thr
            540
                                545
                                                     550
                                                                   2034
gaa atc gag cgc ctg cgc gcc atc ctg tcc gac ggg ggc ctg tat gcg
Glu Ile Glu Arg Leu Arg Ala Ile Leu Ser Asp Gly Gly Leu Tyr Ala
                                                 565
        555
                            560
cgc gac ccc gcc acc ttt acg gcc gcc acc acg gcg ctg gaa aag gca
                                                                   2082
Arg Asp Pro Ala Thr Phe Thr Ala Ala Thr Thr Ala Leu Glu Lys Ala
                        575
                                                                   2130
gag gcc gac ctg acg gcg gcg gaa gaa cgg tgg ctg gaa ctc gaa atg
Glu Ala Asp Leu Thr Ala Ala Glu Glu Arg Trp Leu Glu Leu Glu Met
                                                             600
585
                    590
                                         595
ctg cgc gag acg ctt cag tct tcc tgaacg
                                                                   2160
Leu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Ser
                605
<210> 4
<211> 608
<212> PRT
<213> Gluconacetobacter entanii
Met Ala Ser Pro Pro Leu Leu Leu Leu Gln Asp Ile Thr Leu Thr Leu
Gly Gly Ala Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Phe Gly Val Gly Pro Gly
             20
                                  25
Glu Arg Val Cys Leu Val Gly Arg Asn Gly Cys Gly Lys Ser Thr Leu
                              40
                                                  45
Leu Arg Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gln Ala Asp Asp Gly Thr Val Phe
                                              60
                         55
Val Gln Pro Gly Thr Thr Val Arg Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Asp Leu
                      70
                                          75
Ser Gly Phe Asp Thr Thr Leu Asp Tyr Val Arg Ala Gly Met Gly Pro
                 85
Gly Asp Pro Glu Tyr Arg Ala Glu Leu Leu Leu Thr Glu Leu Gly Leu
                                 105
Asn Gly Thr Glu Asp Pro Ala Thr Leu Ser Gly Gly Glu Ala Arg Arg
        115
                             120
```

❖	
Cys Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala Pro Glu Pr 130 135	ro Asp Leu Leu Leu 140
Asp Glu Pro Thr Asn His Leu Asp Met Pro Th	nr Ile Glu Trp Leu Glu
	55 160
Arg Glu Leu Leu Ser Leu Ser Ser Ala Met Va	al Ile Ile Ser His Asp
165 170	175
Arg Arg Leu Leu Glu Thr Leu Ser Arg Ser Va	al Val Trp Leu Asp Arg
180 185	190
Gly Val Thr Arg Arg Leu Asp Gln Gly Phe A.	
	205
195 200	
Arg Glu Glu Val Leu Glu Glu Glu Glu Arg A	
210 215	220
Arg Gln Ile Ala Arg Glu Glu Asp Trp Met A	0.40
220	35 240
Arg Arg Lys Arg Asn Val Arg Arg Val Ala G	`
245 250	255
Asn Thr Arg Arg Thr Ala Ile Arg Gln Pro G	Gly Gly Leu Lys Met Glu
260 265	270
Ala Arg Glu Ser Asp Leu Ser Gly Lys Leu V	/al Ala Val Ala Glu Asp
275 280	285
Met Ser Arg Ala Tyr Asp Pro Ala His Pro V	Val Val Ser His Leu Asp
	300
290 295 Leu Arg Val Leu Arg Gly Asp Arg Leu Gly 1	
0.10	315 320
Ala Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg Leu Leu 320	335
325 330	
Asp Ser Gly Thr Ile Asn Ile Gly Ser Ala	
340 345	350
Asp Gln Gln Arg Arg Ser Leu Asp Pro Asp	_
355 360	365
Leu Thr Gly Gly Gly Asp Met Val Gln	Val Gly Asn Glu Lys Arg
370 375	380
His Val Ile Gly Tyr Met Lys Asp Phe Leu	Phe Arg Pro Glu Gln Ala
	395 400
Arg Thr Pro Val Gly Val Leu Ser Gly Gly	Glu Arg Trp Arg Leu Met
. 40	
405 410	415
Leu Ala Cys Ala Leu Ala Arg Pro Ser Asn	430
420 425	
Pro Thr Asn Asp Leu Asp Leu Glu Thr Leu	
435 . 440	445
I Ale Com Turn Com Cly Thr Val Leu Leu	Val Ser His Asp Arg Asp

475

Phe Leu Asp Arg Val Ala Ser Ser Ile Leu Met Ala Glu Gly Gly

Lys Trp Val Glu Tyr Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Met Leu Ala Gln Arg

455

470

465

485 490 495

Gln Asp Ala Thr Leu Ala Ala Arg Pro Arg Gln Asp Arg Ala Glu Thr
500 505 510

Thr Pro Ala Arg Thr Asp Val Thr Pro Ser Ser Ser Pro Arg Gln Pro 515 520 525

Ala Arg Lys Met Ser Tyr Lys Asp Lys His Ala Leu Glu Gln Leu Pro
530 535 540

Lys Gln Met Ala Ala Leu Glu Thr Glu Ile Glu Arg Leu Arg Ala Ile 545 550 555 560

Leu Ser Asp Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Asp Pro Ala Thr Phe Thr Ala 565 570 575

Ala Thr Thr Ala Leu Glu Lys Ala Glu Ala Asp Leu Thr Ala Ala Glu 580 585 590

Glu Arg Trp Leu Glu Leu Glu Met Leu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Ser 595 600 605

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

223> Discription of Artificial sequence: primer

<400> 5

tgaacatcct tgaattcgcg aagcggcgtt

30

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

⟨220⟩

223> Discription of Artificial sequence: primer

<400> 6

acggatccag gcgtccggcc tgatcat

[0096]

【配列表フリーテキスト】配列番号5:プライマー 配列番号6:プライマー

【図面の簡単な説明】

【図1】PstIを用いてクローニングされたアセトバクター・アセチ由来の遺伝子断片の制限酵素地図と酢酸耐性遺伝子の位置、及びpABC1への挿入断片とpUCMK181への挿入断片の概略図。

【図2】EcoRIを用いてクローニングされたグルコ ンアセトバクター・エンタニイ由来の遺伝子断片の制限 27

酵素地図と酢酸耐性遺伝子の位置、及びABC11への 挿入断片の概略図。

【図3】酢酸耐性遺伝子破壊株の各種有機酸含有培地で の培養特性を示す図面。

45 【図4】アセトバクター・アセチ由来の酢酸耐性遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸含有培地の培養経過を示す図面。

【図5】グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸含有培地の培養経過を示す図面。



